

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-310809

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. ^a	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 1 B 33/157			C 0 1 B 33/157	
G 0 1 N 30/48			G 0 1 N 30/48	L
30/88			30/88	E

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平7-142586

(22) 出願日 平成7年(1995)5月17日

(71) 出願人 000252300
和光純薬工業株式会社
大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号

(72) 発明者 岩田 勉
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

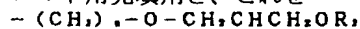
(72) 発明者 瀧内 邦雄
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(72) 発明者 福本 昌巳
兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社大阪研究所内

(54) 【発明の名称】 新規な変性シリカゲル

(57) 【要約】

【目的】 製造が容易でしかも分離能、再現性及び耐久性にすぐれた、生体試料（血清、尿等）中の各種成分の分析に用いられるカラムクロマト用充填剤と、これを



OR₁

[式中、nは3以上の整数を表し、R₁及びR₂は何れか一方が水素原子で、他方は-(CH₂)_mOH（式中、mは2以上の整数を表す。）を表す。]で示される基で置換された変性シリカゲル、又はシラノール基の水素原

子を用いた生体試料中の成分の分析方法を提供。

【構成】 シリカゲルの表面のシラノール基の水素原子の一部又は全部が、ケイ素原子を介して、一般式〔1〕

【化1】

〔1〕

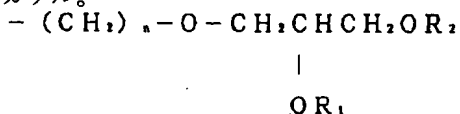
子の一部が上記一般式〔1〕で示される基で置換され、残りの一部又は全部が置換基を有していてもよいアルキル基で置換された変性シリカゲル及びこれを含んでなるカラムクロマトグラフィー用充填剤。

【特許請求の範囲】

【請求項１】 シリカゲルの表面のシラノール基の水素原子の一部又は全部が、ケイ素原子を介して、一般式

$$-(CH_2)_n-O-CH_2CHCH_2OR,$$


〔式中、 n は3以上の整数を表し、 R_1 及び R_2 は何れか一方が水素原子で、他方は $-(CH_2)_mOH$ （式中、 m は2以上の整数を表す。）を表す。〕で示される基で置換された変性シリカゲル。



〔式中、 n は3以上の整数を表し、 R_1 及び R_2 は何れか一方が水素原子で、他方は $-(CH_2)_mOH$ （式中、 m は2以上の整数を表す。）を表す。〕で示される基で置換され、残りの一部又は全部が置換基を有していてもよいアルキル基で置換された変性シリカゲル。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の変性シリカゲルを含んでなるクロマトグラフィー用充填剤。

【請求項4】 請求項3に記載のクロマトグラフィー用充填剤を用いる生体試料中の成分の分析方法。

【請求項5】 請求項3に記載のクロマトグラフィー用
充填剤を用いる成分分析用生体試料の前処理方法。

【請求項6】 請求項3に記載のクロマトグラフィー用充填剤を充填してなるクロマトグラフィー用カラム。

【0001】

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】本発明は、クロマトグラフィー用充填剤、特に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）用の充填剤として有用な変性シリカゲル、及び該変性シリカゲルを含んでなるクロマトグラフィー用充填剤、並びにこれを用いた生体試料（血清、尿等）中の各種成分の分析方法に関する。

【0002】

【発明の背景】HPLCは、生体試料中の各種成分（薬物、代謝物等）の分析手段として広く利用されている。しかしながら、血清等のタンパク質成分を多量に含有する生体試料中の薬物や代謝物等をHPLCを用いて定量する場合には、タンパク質のカラム充填剤への吸着等による弊害を除去するため、従来は除タンパク質処理等の前処理を必要とした。

【0003】しかし、このような前処理操作は、多大の時間と労力を要し、且つ分析誤差及び再現性の悪さの原因となっている。そこで、除タンパク質処理を行うことなく、直接生体試料を分析するためのクロマトグラフィー用充填剤が種々開発されている。しかしながら、いずれの充填剤も一長一短があり満足できるものではない。

[1]

【化 1】

[1]

【請求項 2】 シリカゲルの表面のシラノール基の水素原子の一部が、ケイ素原子を介して、一般式〔1〕

【化2】

[1]

【0004】それらのいくつかの例を以下に示す。このような特性を有する充填剤の先駆けとしては、H. Yoshida, I. Morita and G. Tamai, Chem. Pharm. Bull., 30, 3827 (1982)やH. Yoshida, I. Morita, G. Tamai, T. Masujima, T. Tsuru, N. Takai and H. Imai, Chromatographia, 19, 466 (1984)に記載のタンパク質 コート オクタデシルシリル (protein-coated ODS) 充填剤がある。この充填剤はオクタデシルシリル基 (ODS基) を有するシリカ表面を変性した血漿タンパク質でコートしたものであり、この充填剤を使用することにより、血清試料の直接注入による薬物の分析が可能であることが示されている。しかしながら、これら充填剤では、使用が長期にわたると、吸着させた変性血漿タンパク質が溶離してくる等の耐久性の面での問題点や高分離効率のカラムが得られない等の分離能の面での問題点を有している。

【0005】これらの問題点を解決することを目的として、多孔性担体の内表面に疎水性基、外表面に親水性基を導入した充填剤、所謂、内面逆相(internal-surface reversed phase)充填剤が開発された。この充填剤を用いると、巨大分子である血清中のタンパク質(アルブミンやグロブリン)は充填剤の細孔内に入らず且つ親水性の外表面に吸着されることなくカラムを素通りし、しかも比較的小さな薬物等の分子は疎水性の内表面に吸着させて分離することが可能となる。このような内面逆相の充填剤としては、例えば I. H. Hagestam, T. C. Pinkerton, Anal. Chem., 57, 1757 (1985). や特開昭61-65159号公報等に掲載されているPinkertonカラムと呼ばれているものがある。これは、グリセリルプロピルシリル基を導入した多孔性シリカゲルを原料として、これにカルボニルジイミダゾールを介してオリゴペプチド(グリシル-フェニルアラニル-フェニルアラニン等)を結合させた後、タンパク質加水分解酵素であるカルボキシペプチダーゼAを作用させて外表面のフェニルアラニル側鎖を切断することにより得られる。即ち、充填剤の内表面には、疎水性リガンドであるグリシル-フェニルアラニル-フェ

ニルアラニン有し、外表面には、親水性リガンドであるグリシルーグリセリルプロピルシリル基を有する充填剤がそれである。しかしながら、この充填剤は、疎水性が低いため、親水性薬物や代謝物の分離には不向きである。また、外表面のグリシル残基のカルボキシル基の解離のために使用可能な移動相のpH範囲がpH 6~7.5と限定されるという問題点、更には製造に酵素反応を利用しているため、工程が複雑化し、且つ品質がばらつき易い等の問題点も有している。

【0006】また、類似の原理で製造された充填剤として、特開平1-123145号公報に記載のものがある。これは、アミノプロピルシリル基を導入した多孔性シリカを出発原料として、トリエチルアミン存在下、オクタノイルクロライドを反応させることによりアミド結合を介して疎水性基を導入し、次に、ポリメキシシアシラーゼにより外表面のアシル基を加水分解して、外表面にアミノ基を生成させ、これをグリシドールと反応させて外表面を親水性とすることにより得られる充填剤である。しかしながら、この充填剤も、製造に酵素反応を利用しているため、工程が複雑化し、且つ品質がばらつき易いという問題点がある。

【0007】更にまた、類似の原理で製造された充填剤として、特開平5-203636号公報記載のものがある。これは、グリセリルプロピルシリル基を導入した多孔性シリカゲルを原料とし、トリエチルアミン存在下、脂肪酸塩化物と反応させて、脂肪酸エステルからなる疎水性基を導入した後、リパーゼにより外表面のアシル基を加水分解する方法により得られる（内表面には疎水性の脂肪酸エステルが残り、外表面には、親水基であるグリセリルプロピルシリル基を有する充填剤）。しかしながら、この充填剤も製造に酵素反応を利用しているため、工程が複雑化し、且つ品質がばらつき易いという問題点がある。

【0008】このような問題点を解決するために酵素の代わりにプラズマを用いて充填剤を製造することも試みられている（特公平4-68244号公報、特公平4-61809号公報等）。即ち、例えば疎水性基（ODS基等）を導入した多孔性シリカをプラズマ処理して、外表面のODS基を選択的に脱離させ、次に外表面にγ-グリシドキシプロピルシリル基を導入して、酸によりエポキシ環を開環させてグリセリルプロピルシリル基としてシリカ外表面に親水性のグリセリルプロピルシリル基、内表面に疎水性のODS基を導入した内面逆相の充填剤を製造する方法がそれである。しかしながら、このような製造方法も前記の酵素を用いた製造方法と同様に、工程が複雑化し、且つ品質がばらつき易いという問題点を依然として有している。

【0009】また、プラズマの代わりに酸を用いて充填剤を製造する方法も試みられている（特開平2-59415号公報等）。即ち、ODS基を導入した多孔性シリカを酸処

理することにより、選択的に外表面のODS基を脱離させ、次にγ-グリシドキシプロピルトリメトキシシランを用いてシリカ外表面に親水性のグリセリルプロピルシリル基を導入するという方法である。この製法は、簡便であるという利点は有しているものの、依然として充填剤の品質がばらつき易いという問題点を有している。

【0010】また、シリル化剤の反応性の差を利用した内面逆相充填剤の製造も試みられている（特開昭64-16962号公報等）。即ち、シリカ細孔内への拡散速度に比べて、反応速度が大であるシリル化剤（例えば脱離基としてN-メチルアセトイミド基を持つ非常に反応性に富んだペルフルオロブチルエチレンジメチルシリル-N-メチルアセトイミド）を用いることにより細孔外表面だけを選択的にシリル化し、次に、オクタデシルジメチルシリルクロライドで内表面を修飾することにより外表面に親水性のペルフルオロブチルエチレンジメチルシリル基、内表面にODS基を有する充填剤を製造する方法である。しかし、この製法についても得られる充填剤の品質がばらつき易いという問題点が依然としてある。

【0011】多孔性担体の内表面と外表面の反応性の差を利用した内面逆相充填剤の製造方法としては特開平3-107759号公報記載のものもある。即ち、先ず多孔性シリカに緩和な条件（無触媒）でγ-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランを反応させて実質的に外表面のみに修飾を行い、次いで、N,N-ジイソプロピルエチルアミン（縮合触媒）存在下の強い反応条件で、フェニルトリメトキシシランを内表面に導入し、更に、これを酸で処理してエポキシ環を開環させ、外表面に親水性のグリセリルプロピルシリル基、内表面に疎水性のフェニル基を導入した内面逆相の充填剤を製造する方法がそれである。しかしながら、この方法に於ても、細孔の内外表面における反応性の差が少ないために反応条件設定が難しく、得られる充填剤の品質にばらつきが生じ易いという問題点がある。

【0012】以上に述べた如く、内面逆相充填剤は、親水性基と疎水性基とを内表面及び外表面に別々に導入して製造される為、得られる充填剤の品質がばらつき、その結果これらの充填剤を用いても再現性の良いデータを得難いという問題点があった。

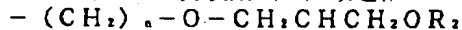
【0013】そこで、多孔性担体の内表面及び外表面に親水性基相と疎水性基相が存在する混成機能相（mixed functional phase）充填剤が開発された。この種の充填剤では、タンパク質のような巨体分子は親水性基には吸着されずに素通りし、薬物等の比較的小さな分子は疎水性基に分離吸着されることになる。

【0014】このような混成機能相充填剤としては、特開平4-40366号公報記載のものがある。これは、多孔性シリカの内表面及び外表面に親水性のγ-グリシドキシプロピルシリル基を導入し、次に、疎水性のアルキル基（ブチル基、オクチル基等）やフェニル基を導入する。

そして、グリシドキシ基を加水分解してジオール基を生成させた後、再度、グリシドキシ基を酸加水分解させながら、γ-グリシドキシプロピルシリル基を導入している。しかしながら、この方法に於ても、疎水性基と親水性基の導入量を調製することが困難であるという問題点はかなり改善されてきてはいるが、得られる充填剤の分離能等がよいという問題点が残る。

【0015】また、シリコンポリマーで被覆された多孔性担体に親水性基と疎水性基が導入された混成機能相充填剤として特開平5-72190号記載のものもある。これは、多孔性担体をSiH基を有するポリマーで被覆し、このポリマーのSiH基に二重結合を有する疎水性基（スチレン、1-オクテン、1-オクタデセン等）、及び親水性基（ポリオール）を反応させて製造する。しかしながら、この方法に於ても、製造時の操作が複雑であること、親水性基と疎水性基の導入量を調製するのが困難であること、且つ、多孔性担体のSiH基を有するポリマーでの被覆率を上げるのが困難なため得られる充填剤の塩基性物質の分離能がよいこと等の問題点がある。

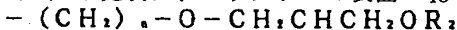
【0016】一方、多孔性単体を、親水性基としての機能と疎水性基としての機能という異なった二つの機能を併せ持つアルキルシリル基で修飾した充填剤、即ち、二村等によりBinary-Layered Phase充填剤と呼ぶことが提案されている充填剤がある〔第36回液体クロマトグラフィー研究会講演要旨集p.68(1993)〕。この種の充填剤は、タンパク質等の巨大分子は、親水性部分には吸着されず素通りし、薬物等の比較的小さな分子は、疎水性部分に吸着され分離されるという機能を有するものである。このような充填剤としては例えば特開昭64-16961号公報記載の充填剤がある。即ち、多孔性担体にリービング原子団としてN-メチルアセタミド基等を有するシリル化剤を用いて、グリセリルプロピルジメチルシランのジオールをケタール型に修飾した官能基を導入した充填剤を得ている。しかし、この充填剤の性能は、上記公開公報中に記載された如く特開昭64-16962号公報記載の親水性基と疎水性基を別々に導入した充填剤（二区域逆相



OR₁

【0021】〔式中、nは3以上の整数を表し、R₁及びR₂は何れか一方が水素原子で、他方は-(CH₂)_mOH（式中、mは2以上の整数を表す。）を表す。〕で示される基で置換された変性シリカゲルの発明である。

【0022】また、（2）本発明は、シリカゲルの表面



OR₁

【0024】〔式中、nは3以上の整数を表し、R₁及

充填剤）より劣るというものであった。

【0017】また、多孔性シリカの内表面及び外表面に、親水性基としての機能と疎水性基としての機能と異なった二つの機能を併せ持つ基を導入し、且つその親水性基としての機能を有する部分がジオールの形になっている充填剤として、特開平2-45758号公報記載の充填剤がある。これは、例えばシリカゲルに5,6-エポキシヘキシルシリル基等を導入した後、酸処理することにより得られる、5,6-ジヒドロキシヘキシルシリル基で修飾した充填剤である。また、Y.Sudoらにより、従来から使われていたγ-グリシドキシプロピルトリメトキシシランのプロピル部分をブチル、メチルブチル、ヘキシルに変えたものを合成し、これを用いてγ-グリシドキシアルキル基を多孔性シリカに導入した後、酸でエポキシ環を開環することにより得られる充填剤も報告されている（Y.Sudo, M.Akiba, T.Sakaki and Y.Takahata, J.Liq.Chromatogr. 17, 1743(1994)）。これらの充填剤は疎水性基と親水性基の導入量の調整が簡単であるという利点はあるが、親水性薬物の分析に於て、薬物のピークの分離が良好でないという問題点を有している。

【0018】

【発明の目的】本発明は、上記した如き状況に鑑みなされたもので、製造が容易でしかも分離能、再現性及び耐久性がすぐれた、生体試料（血清、尿等）中の各種成分の分析に用いられるカラムクロマト用充填剤として有用な変性シリカゲルと、該変性シリカゲルを含んでなるクロマトグラフィー用充填剤及びこれを用いた生体試料中の成分の分析方法並びに該充填剤を含んでなるクロマトグラフィー用カラムを提供することを目的とする。

【0019】

【発明の構成】本発明は、（1）シリカゲルの表面のシラノール基の水素原子の一部又は全部が、ケイ素原子を介して、一般式〔1〕

【0020】

〔化3〕

〔1〕

のシラノール基の水素原子の一部が、ケイ素原子を介して、一般式〔1〕

【0023】

〔化4〕

〔1〕

びR₂は何れか一方が水素原子で、他方は-(CH₂)_m

OH（式中、 m は2以上の整数を表す。）を表す。］で示される基で置換され、残りの一部又は全部が置換基を有していてもよいアルキル基で置換された変性シリカゲルの発明である。

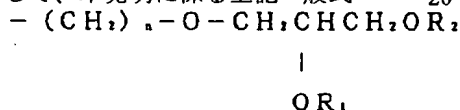
【００２５】更に、本発明は、（３）上記（１）又は（２）に記載の変性シリカゲルを含んでなるクロマトグラフィー用充填剤の発明である。

【００２６】更にまた、本発明は、（４）上記（３）に記載のクロマトグラフィー用充填剤を用いる生体試料中の成分の分析方法の発明である。

【００２７】また、本発明は、（５）上記（３）に記載のクロマトグラフィー用充填剤を用いる成分分析用生体試料の前処理方法の発明である。

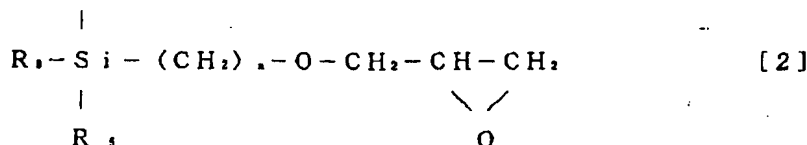
【００２８】更に、本発明は、（６）上記（３）に記載のクロマトグラフィー用充填剤を充填してなるクロマトグラフィー用カラムの発明である。

【0029】即ち、本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、シリカゲルの表面（内表面及び外表面）のシラノール基の水素原子の一部又は全部を、ケイ素原子を介して、本発明に係る上記一般式



【0033】で示される基の R_1 及び R_2 は、何れか一方が水素原子で、他方は $-(CH_2)_mOH$ を表わす。ここで、 m は2以上の整数を表し、好ましくは2～15の整数を表す。また、上記一般式〔1〕に於て、 n は3以上の整数を表し、好ましくは3～5の整数を表す。

【0034】本発明の変性シリカゲルに於て、ケイ素原子を介して導入される置換基を有していてもよいアルキル基のアルキル基としては、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基等のアルキル基が挙げられ、（直鎖状、分枝状の何れでも可。）、好ましくはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等の低級アルキル基



【0038】〔式中、 R_3 、 R_4 、 R_5 は夫々独立して炭素数1～6のアルキル基又は炭素数1～6のアルコキシ基を表し、 R_3 、 R_4 、 R_5 の少なくとも1つはアルコキシ基である。また、 n は3以上の整数を表す。〕で示されるシランカップリング剤とを酸性又は塩基性触媒存在下で反応させる。

【0039】次いで、得られた変性シリカゲルを酸性又

〔１〕で示される基で置換させる、又はシリカゲルの表面（内表面及び外表面）のシラノール基の水素原子の一部をケイ素原子を介して、本発明に係る上記一般式

〔１〕で示される基で置換させ、残りの一部又は全部を置換基を有していてもよいアルキル基で置換させることにより、生体試料（血清、尿等）中のタンパク質と薬物との分離能が高く、且つ、薬物間の分離能も高いクロマトグラフィー用充填剤として有用な変性シリカゲルが得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0030】本発明の変性シリカゲルの原料として用いられるシリカゲルは、最終的に得られる本発明の変性シリカゲルのクロマトグラフィー用充填剤としての機能に影響を与えるものでなければ特に限定されないが、例えば粒子径2～50 μm 、比表面積300～800 m^2/g 、細孔径50～100オングストロームの球形、或は破砕形のシリカゲルが好ましく挙げられる。

【0031】本発明の変性シリカゲルに於て、ケイ素原子を介して導入される一般式〔1〕

【0032】

【化5】

[1]

が挙げられる。置換基としては例えば、フェニル基、トリル基、キシリル基等の芳香族の基が好ましく挙げられる。また、導入される置換基を有していてもよいアルキル基は、1種類に限定されることなく複数種の基が導入されていてもよい。

【0035】本発明の変性シリカゲルの製法は、特に限定されるものではないが、例えば、下記のような製法が挙げられる。

【0036】・製法1

先ず、上述した如きシリカゲルと一般式〔2〕

【 0 0 3 7 】

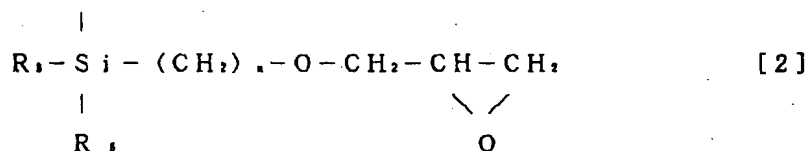
【化6】

は塩基性触媒存在下で炭素数 2 以上のジオール化合物と反応させれば、シリカゲルの内表面及び外表面のシラノール基の水素原子の一部又は全部が、ケイ素原子を介して一般式〔1〕で示される基で置換された本発明の変性シリカゲルが得られる。

【0040】これを更に、アルキル基を有するシランカップリング剤と反応させ、然る後、一般式〔1〕で示さ

れる基の水酸基に結合したアルキルシリル基を酸で加水分解させれば、シリカゲルの内表面及び外表面のシラノール基の水素原子の一部がケイ素原子を介して本発明に係る一般式〔1〕で示される基で置換され、残りの一部又は全部がアルキル基で置換された本発明の変性シリカゲルが得られる。

【0041】シラノール基の水素原子の一部が、ケイ素原子を介して、一般式〔1〕で示される基で置換され、残りの一部又は全部がアルキル基で置換された変性シリカ



【0045】〔式中、 R_3 、 R_4 、 R_5 及び n は前記と同じ。〕で示されるシランカップリング剤を反応させる。

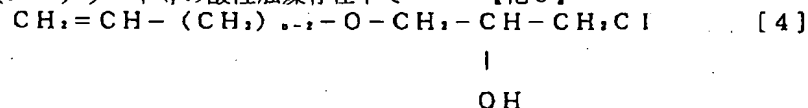
【0046】得られた変性シリカゲルを酸性又は塩基性触媒存在下に炭素数2以上のジオール化合物と反応させれば目的の変性シリカゲルを得ることができる。

【0047】これら製造方法に於て用いられる試薬類についてさらに詳細に説明すると下記の通りである。

【0048】上記製法1及び製法2で用いられる一般式〔2〕で示されるシランカップリング剤の具体例としては、例えばグリシドキシプロピルトリメトキシシラン、

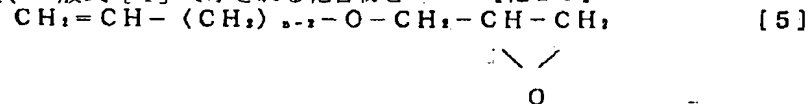


【0051】〔式中、 n は3以上の整数を示す。〕で示されるアルコールとエピクロロヒドリンとを例えば濃硫酸、三フッ化ホウ素エーテラート等の酸性触媒存在下で



【0053】〔式中、 n は前記と同じ。〕で示される化合物とする。

【0054】次いで、一般式〔4〕で示される化合物を



【0056】〔式中、 n は前記と同じ。〕で示されるエポキシ体とする。このエポキシ体と一般式〔6〕



【0058】〔式中、 R_3 、 R_4 及び R_5 は前記と同じ。〕で示されるシラン化合物とを塩化白金酸等を触媒

カゲルは、また、下記の方法でも製造することができる。

【0042】・製法2

即ち、先ず、上述した如きシリカゲルとアルキル基を有するシランカップリング剤とを反応させる。

【0043】次いで、得られた変性シリカゲルに酸性又は塩基性触媒存在下、一般式〔2〕

【0044】
【化7】

ジエトキシグリシドキシプロピルメチルシラン、ジメチルグリシドキシプロピルエトキシシラン等の市販品が挙げられるが、市販されていないものについては、例えば Y. Sudo, M. Akiba, T. Sakaki and Y. Takahata, J. Liq. Chromatogr. 17, 1743 (1994) 等に記載の方法により容易に得ることができる。

【0049】即ち、例えば一般式〔3〕

【0050】
【化8】

縮合させ、一般式〔4〕

【0052】
【化9】

水酸化ナトリウムで処理し、一般式〔5〕

【0055】
【化10】

【0057】
【化11】

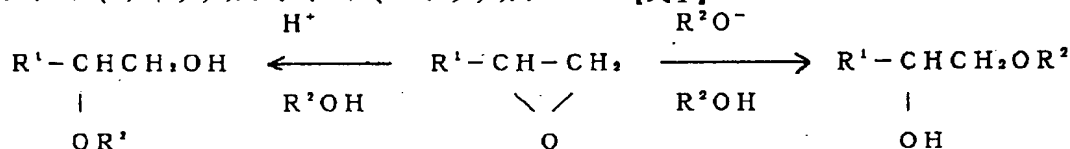
として縮合させることにより容易に一般式〔2〕で示されるシランカップリング剤を得ることができる。

【0059】シリカゲルと一般式〔2〕で示されるシランカップリング剤との反応は、一般には日本分析化学会関東支部編、“高速液体クロマトグラフィーハンドブック”丸善、東京（1985）p.195記載の様に無水の溶媒中で行われる。シランカップリング剤の導入量は使用するシランカップリング剤の種類や、反応条件等より任意に変えることが可能である。

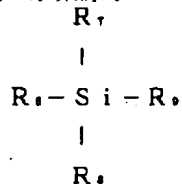
【0060】この際に用いられる塩基性触媒としては、ピリジン、トリエチルアミン等が挙げられ、また、酸性触媒としては、p-トルエンスルホン酸、三フッ化ほう素エーテラート等が挙げられる。

【0061】反応溶媒としてはベンゼン、トルエン、キシレン等が好ましいものとして挙げられる。反応温度は通常室温から200℃が好ましい範囲である。

【0062】また、製法1及び製法2に於て用いられる炭素数2以上のジオール化合物としては、具体的にはエチレングリコール、プロパンジオール、ブタンジオール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、ヘプタンジオール、オクタンジオール、ノナンジオール、デカンジオール、ウンデカンジオール、ドデカンジオール、トリ



【0066】変性シリカゲルとジオールとの反応は、無溶媒で行なってもよいが、適当な溶媒を使用して行なってもよい。この際に用いられる好適な溶媒としては、例えばジクロロメタン、クロロホルム、1,2-ジクロロエタン、1,1,1-トリクロロエタン、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等が挙げられる。また、この際の反応温度は通常室温から200℃の範囲から適宜選択される。この様にして容易にシリカゲルの内表面及び外表面のシラノール基の水素原子の一部又は全部が、ケイ



【0069】〔式中、R₆、R₇、R₈は夫々独立して炭素数1～6のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基又はハロゲン原子を表す。但し、R₆、R₇、R₈の少なくとも1つはアルコキシ基又はハロゲン原子である。R₉は炭素数1～6のアルキル基を表し、また、置換基として芳香族基が置換していてもよい。〕で示されるシランカップリング剤等が挙げられる。

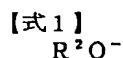
【0070】尚、一般式〔7〕で示されるシランカップ

ジオール等が挙げられる。

【0063】また、該ジオールを反応させる際に使用される酸性触媒としては、例えば塩酸、硫酸、リン酸等の鉱酸、三フッ化ほう素エーテラート等のルイス酸が挙げられ、また、塩基性触媒としては、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ナトリウムメチラート、ナトリウムエチラート、炭酸カリウム等が挙げられる。

【0064】尚、村橋俊一、“新実験化学講座14(1)”日本化学会編、丸善、東京（1977）p.582に記載されているようにオキシラン（エポキシ）化合物とアルコールを酸性又は塩基性触媒の存在下反応させて、β-ヒドロキシエーテルを製造することは、この技術分野においてよく知られている。また、非対称オキシランでは、酸性と塩基性条件とで環の開環方向が異なってくるので、酸性触媒を用いることにより、本発明に係る一般式〔1〕で示される基のR₁に置換基、R₂に水素原子を導入することができ、一方、塩基性触媒を用いることにより、本発明に係る一般式〔1〕のR₁に水素原子、R₂に置換基を導入することができる（下記式1参照。）。

【0065】



素原子を介して、一般式〔1〕で示される基で置換された本発明の変性シリカゲルを製造することができる。

【0067】また、製法1及び製法2で用いられるアルキル基を有するシランカップリング剤としては、ヘキサメチルジシラザン、ヘキサメチルシクロトリシラザン、オクタメチルシクロテトラシラザン、一般式〔7〕

【0068】

〔化12〕

〔7〕

リング剤の具体例としては、トリメチルクロロシラン、トリメチルメトキシシラン、トリメチルエトキシシラン、トリメチル-n-プロポキシシラン、ジメチルジクロロシラン、ジメチルジメトキシシラン、ジメチルジエトキシシラン、メチルトリクロロシラン、メチルトリメトキシシラン、メチルトリエトキシシラン、メチルトリ-n-プロポキシシラン、トリエチルクロロシラン、ジエチルジクロロシラン、ジエチルジエトキシシラン、エチル

ジメチルクロロシラン、エチルメチルジクロロシラン、エチルトリクロロシラン、エチルトリメトキシシラン、エチルトリエトキシシラン、トリ-n-プロピルクロロシラン、ジ-n-プロピルジクロロシラン、n-プロピルジメチルクロロシラン、メチル-n-プロピルジクロロシラン、n-プロピルトリクロロシラン、n-プロピルトリメトキシシラン、トリイソプロピルクロロシラン、ジイソプロピルジクロロシラン、イソプロピルジメチルクロロシラン、メチルイソプロピルジクロロシラン、トリ-n-ブチルクロロシラン、ジ-n-ブチルメチルクロロシラン、ジ-n-ブチルジクロロシラン、n-ブチルジメチルクロロシラン、n-ブチルメチルジクロロシラン、n-ブチルトリクロロシラン、i-ブチルトリクロロシラン、i-ブチルトリメトキシシラン、ジ-t-ブチルメチルクロロシラン、ジ-t-ブチルジクロロシラン、t-ブチルジメチルクロロシラン、t-ブチルトリクロロシラン、ペンチルトリクロロシラン、ペンチルトリメトキシシラン、ペンチルトリエトキシシラン、ヘキシルトリクロロシラン、ヘキシルメチルジクロロシラン、ヘキシルトリメトキシシラン、ヘキシルトリエトキシシラン、ベンジルトリクロロシラン、ベンジルジメチルエトキシシラン、β-フェネチルトリクロロシラン、メチル-β-フェネチルジクロロシラン等が挙げられる。

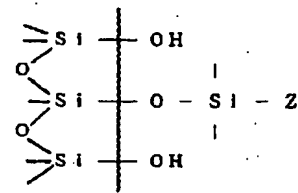
【0071】アルキル基を有するシランカップリング剤との反応は、一般には無水条件下で実施されるが、少量の水を加えるのは任意である。また、この反応に使用される好適な反応溶媒の例としてはベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられる。また、反応温度としては通常室温から200℃の範囲である。尚、シリカゲルに一般式〔1〕で示される基を導入した後に、アルキル基を有するシランカップリング剤を反応させると、一般式〔1〕で示される基の水酸基もアルキルシリル化されるので、この水酸基に結合したアルキルシリル基を、例えばアセトニトリル、メタノール、エタノール等を含む酸の水溶液で処理する等により除去する必要がある。この処理に用いられる酸としては、例えば、塩酸、硫酸、過塩素酸、磷酸、p-トルエンスルホン酸等が挙げられ、反応温度は通常室温から200℃の範囲である。この様にして容易にシリカゲルの内表面及び外表面のシラノール基の水素原子の一部が本発明に係る一般式〔1〕で示される基で置換され、残りの一部又は全部がアルキル基で置換された変性シリカゲルを製造することができる。

【0072】本発明の変性シリカゲルに於て、シラノール基の水素原子にケイ素原子を介して前記一般式〔1〕で示される基あるいは置換されていてもよいアルキル基が導入される態様としては、例えば下記式2～式5に示される態様等が挙げられる。これらは、使用するシランカップリング剤の種類や反応条件等により左右される。

【0073】

【式2】

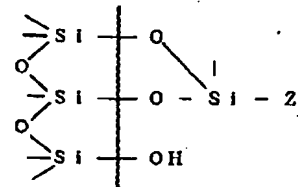
05



【0074】

【式3】

10

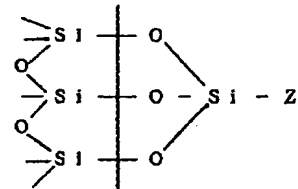


15

【0075】

【式4】

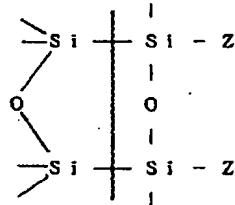
20



【0076】

【式5】

25



30

【0077】尚、Zは前記一般式〔1〕又は置換されていてもよいアルキル基を示す。本発明のクロマトグラフィー用充填剤は、上述した如き本発明の変性シリカゲルを含んでなることを特徴とする。

【0078】本発明の変性シリカゲルを含んでなる充填剤は一般の逆相カラム充填剤と同様に用いることができるが、特にタンパク質成分を多量に含有する生体試料中の成分の分析及び濃縮に有効である。

【0079】本発明のクロマトグラフィー用カラムは上記本発明のクロマトグラフィー用充填剤を充填してなることを特徴とする。

【0080】本発明のクロマトグラフィー用カラムは、例えば、内径(φ)1～10mm、好ましくは2～6mm、長さ10～500mm、好ましくは10～300mmのステンレス製のカラムに本発明の変性シリカゲルをスラリー法等、常法に従って充填することにより得られる。

【0081】本発明のクロマトグラフィー用充填剤を用いて生体試料中の成分を分析する際の移動相としては、タンパク質が変性しない溶媒、好ましくは有機溶媒含有

50

量が30%以下のアセトニトリル、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、エタノール等や水溶媒等が好ましく挙げられ、特に好ましいものとしてはアセトニトリルと水との混合溶媒又は水が挙げられる。また、移動相には、有機溶媒や水以外に必要に応じて例えばリン酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩等、通常この分野で用いられる緩衝剤が入っていても良い。また、グラジエント操作を行うことにより有機溶媒の濃度を順次変えることも任意である。また、移動相のpHは目的物質を分析し得る範囲であれば特に限定されないが、カラムライフを考慮するとpH 2~7.5が好ましい範囲として挙げられる。

【0082】本発明の充填剤を用いた分析方法に於て、溶出時の流速は、通常、0.1~5ml/min、好ましくは0.5~2ml/minの範囲から適宜選択される。カラム温度は、通常、0~60℃、好ましくは20~50℃の範囲から適宜選択される。

【0083】上記した如き条件下で分析を行うことにより、タンパク質成分を大量に含有する生体試料中の薬物等（例えば、フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトイン、リドカイン、プリミドン、イミプラミン、インドメタシン、クロラムフェニコール、トリメトプリム、ニトラゼパム、フロセミド、エテンザミド、サリチルアミド、イブプロフェン、トルブタミド、アセトアミノフェン等）の成分を除タンパク質処理することなく容易に且つ簡便に分析することが可能となる。即ち、シリカゲルに本発明に係る一般式〔1〕で示される置換基を導入することにより、タンパク質等の巨大分子は、本発明に係る一般式〔1〕で示される基中の末端水酸基及びエーテル部分構造によって、変性することなく素通りし、そのままカラム外に排出される。一方、比較的分子の小さい化合物（薬物等）は、本発明に係る一般式

〔1〕で示される基、又は本発明に係る一般式〔1〕で示される基とアルキル基によって、疎水性の差に従い、分離溶出される。尚、この際、本発明に係る一般式

〔1〕で示される基とアルキル基とが共に導入された本発明の変性シリカゲルを含んでなる充填剤を用いた場合の方が薬物等の分離能が高い。

【0084】本発明の変性シリカゲルを含んでなる充填剤は、また、タンパク質が変性せずに素通りし、薬物等の低分子化合物は保持されるということを利用して、除タンパク質用前処理カラム充填剤としても、用いることが出来る。

【0085】即ち、本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムに生体試料を通すことにより、生体試料中の薬物等の微量成分を濃縮すると共に、タンパク質成分をカラム外に排除する。次に、本発明のカラム内で濃縮された薬物等の微量成分を一般の逆相カラム（分析用カラム）に導き分析を行うのである。この時カラムスイッチング法として知られている移動相の流路を高圧

六方バルブ等を用いて自動的に切り換える手法等を用いることも任意である。

【0086】以上のように本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムを除タンパク質用前処理カラムとし、一般の逆相系カラムを分析用カラムとしてこれらを組合せて用いることにより、生体試料中等の濃度の低い薬物等を高感度に分析することができる。勿論、本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムをそのまま分析用カラムとして用いても良いことは言うまでもない。

【0087】次に本発明を実施例及び参考例によって具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

【0088】

【実施例】

参考例1 3-グリシドキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成（細孔径約80オングストローム、平均粒子径5μmのシリカゲルを用いた場合）

細孔径約80オングストローム、平均粒子径5μmの球形シリカゲル20gにトルエン400mlを加え、共沸により水を除いた後、水0.82ml、3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン19.67g及びトリエチルアミン6mlを加えて8時間還流させた。冷却後、得られたシリカゲルを濾取し、トルエン400ml、メタノール400ml、水1000ml、アセトン400ml及びメタノール400mlの順で洗浄した後、真空乾燥機にて85℃で乾燥し、3-グリシドキシプロピルシリル基を有するシリカゲル25.8gを得た。

【0089】参考例2 2,3-ジヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成（細孔径約80オングストローム、平均粒子径5μmのシリカゲルを用いた場合）

参考例1で得られた変性シリカゲル4gに0.7%過塩素酸水溶液180ml及びアセトニトリル20mlを加え、6時間還流させた。冷却後、得られたシリカゲルを濾取し、メタノール200ml、水500ml、アセトン200ml及びメタノール200mlの順で洗浄した後、真空乾燥機にて85℃で乾燥し、2,3-ジヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル2.7gを得た。

【0090】参考例3 5,6-ジヒドロキシヘキシルシリル基を有するシリカゲルの合成（細孔径約80オングストローム、平均粒子径5μmのシリカゲルを用いた場合）
細孔径約80オングストローム、平均粒子径5μmの球形シリカゲル7.5g、トルエン150ml、水0.46ml、5,6-エポキシヘキシルトリメトキシシラン6.9g、トリエチルアミン2.25mlを用いて参考例1と同様に処理を行って5,6-エポキシヘキシルシリル基を有するシリカゲル9.6gを得た。このシリカゲル8.0g、0.7%過塩素酸水溶液360.45ml及びアセトニトリル40.05mlを用いて参考例2と同様に処理を行って5,6-ジヒドロキシヘキシルシリル基を有するシリカゲル7.9gを得た。

【0091】実施例1 2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例1で得られた変性シリカゲル 3.5gにクロロホルム 5ml、エチレングリコール 4.34g、及びBF₃·Et₂O 0.2gを加え、4時間還流させた。冷却後、得られたシリカゲルを濾取し、メタノール 200ml、水 500ml、アセトン 200ml及びメタノール200mlの順で洗浄した後、真空乾燥機にて85℃で乾燥し、2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.3gを得た。

【0092】実施例2 2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例1で得られた変性シリカゲル 2.3gにトルエン 1.5ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 4.6mlを加え、8時間還流させた。冷却後、得られたシリカゲルを濾取し、トルエン 200ml、メタノール 200ml、水 500ml、アセトン 200ml及びメタノール 200mlの順で洗浄した後、真空乾燥機にて85℃で乾燥した。このシリカゲルに0.7%過塩素酸水溶液 93.15ml及びアセトニトリル 10.35mlを加え、2時間還流させた。冷却後、得られたシリカゲルを濾取し、メタノール 200ml、水 500ml、アセトン 200ml及びメタノール 200mlの順で洗浄した後、真空乾燥機にて85℃で乾燥し、2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル1.7gを得た。

【0093】実施例3 2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例1で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5ml、ブタンジオール 6.31g、及びBF₃·Et₂O 0.2gを用いて実施例1と同様に処理を行い2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.3gを得た。

【0094】実施例4 2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例3で得られた変性シリカゲル 2.2gにトルエン 11ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 4.4mlを用いて実施例2と同様の処理を行って2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル 1.8gを得た。

【0095】実施例5 2-(6-ヒドロキシヘキシルオキ

シ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例1で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5ml、ヘキサンジオール8.27g、及びBF₃·Et₂O 0.2gを用いて実施例1と同様の処理を行って2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.3gを得た。

【0096】実施例6 2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例5で得られた変性シリカゲル 2.3gにトルエン 1.5ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 4.6mlを用いて実施例2と同様の処理を行って2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル 1.9gを得た。

【0097】参考例4 2-ブトキシ-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約80オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例1で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5ml、ブタノール5.19g、及びBF₃·Et₂O 0.2gを用いて実施例1と同様の処理を行って2-ブトキシ-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.4gを得た。

【0098】参考例5 3-グリシドキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

細孔径約60オングストローム、平均粒子径5 μ mの球形シリカゲル 20g、トルエン 400ml、水 1.03ml、グリシドキシプロピルトリメトキシシラン 26.14g、トリエチルアミン 6mlを用いて参考例1と同様の処理を行って3-グリシドキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 27.7gを得た。

【0099】参考例6 2,3-ジヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例5で得られた変性シリカゲル 3.5g、0.7%過塩素酸水溶液 157.5ml及びアセトニトリル 17.5mlを用いて参考例2と同様の処理を行って2,3-ジヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.4gを得た。

【0100】参考例7 5,6-ジヒドロキシヘキシルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

細孔径約60オングストローム、平均粒子径5 μ mの球形

シリカゲル 7.5g、トルエン 150ml、水 0.59ml、5,6-エポキシヘキシルトリメトキシシラン 13.0g、トリエチルアミン 2.25mlを用いて参考例 1 と同様の処理を行って 5,6-エポキシヘキシルシリル基を有するシリカゲル 10.6gを得た。このシリカゲル 8.7g、0.7%過塩素酸水溶液 390.6ml及びアセトニトリル 43.4mlを用いて参考例 2 と同様の処理を行って 5,6-ジヒドロキシヘキシルシリル基を有するシリカゲル 8.5gを得た。

【0101】参考例 8 2-(3,4-ジヒドロキシシクロヘキシル)エチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mの球形シリカゲル 5.0g、トルエン 100ml、水2.0ml、2-(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン 5.0g、トリエチルアミン 1.50mlを用いて参考例 1 と同様の処理を行って2-(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルシリル基を有するシリカゲル 6.2gを得た。このシリカゲル 2.0g、0.7%過塩素酸水溶液 80.0ml及びアセトニトリル20.0mlを用いて参考例 2 と同様の処理を行って2-(3,4-ジヒドロキシシクロヘキシル)エチルシリル基を有するシリカゲル 1.9gを得た。

【0102】実施例 7 2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例 5 で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5.0ml、エチレングリコール 5.65g、及びBF₃·Et₂O 0.26gを用いて実施例 1 と同様の処理を行って2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.4gを得た。

【0103】実施例 8 2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例 7 で得られた変性シリカゲル 2.3gにトルエン 1.5ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 4.6mlを用いて実施例 2 と同様の処理を行って2-(2-ヒドロキシエトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル 1.9gを得た。

【0104】実施例 9 2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例 5 で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5ml、ブタンジオール 8.20g、及びBF₃·Et₂O 0.26gを用いて実施例 1 と同様の処理を行って2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基

を有するシリカゲル 3.3gを得た。

【0105】実施例 10 2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例 9 で得られた変性シリカゲル 2.3gにトルエン 1.5ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 2.3mlを用いて実施例 2 と同様の処理を行って2-(4-ヒドロキシブトキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル 1.9gを得た。

【0106】実施例 11 2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

参考例 5 で得られた変性シリカゲル 3.5g、クロロホルム 5ml、ヘキサンジオール10.75g、及びBF₃·Et₂O 0.26gを用いて実施例 1 と同様の処理を行って2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基を有するシリカゲル 3.3gを得た。

【0107】実施例 12 2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例 11 で得られた変性シリカゲル 2.4gにトルエン 12ml及び1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラザン 4.8mlを用いて実施例 2 と同様の処理を行って2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びトリメチルシリル基を有するシリカゲル 2.0gを得た。

【0108】実施例 13 2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びジメチルシリル基を有するシリカゲルの合成(細孔径約60オングストローム、平均粒子径 5 μ mのシリカゲルを用いた場合)

実施例 11 で得られた変性シリカゲル 4.0gにトルエン 20ml及び1,1,3,3,5,5-ヘキサメチルシクロトリシラザン 8.4gを用いて実施例 2 と同様の処理を行って2-(6-ヒドロキシヘキシルオキシ)-3-ヒドロキシプロポキシプロピルシリル基及びジメチルシリル基を有するシリカゲル 3.7gを得た。

【0109】実施例 14 牛血清アルブミンの回収試験
実施例 1、3、5 及び参考例 2、3、4 で製造した変性シリカゲルを内径4.6mm、長さ50mmのHPLC用ステンレスカラムにスラリー法によって充填した。各カラムを用いて下記に示した分析条件で牛血清アルブミン(以下、BSAと略記する。)を処理し、その回収率を求めた。表 1 にその結果を示す。

【0110】〔分析条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル
=90/10 (v/v)

流速：0.5ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

試料：BSA 15mg/mlを上記移動相に溶解した液

注入量：20 μ l

【0111】

表 1

充填剤の種類	BSA回収率%
参考例2のシリカゲル	97.4
参考例3のシリカゲル	97.2
実施例1のシリカゲル	95.8
実施例3のシリカゲル	95.8
実施例5のシリカゲル	96.4
参考例4のシリカゲル	49.1

【0112】表1の結果から、実施例1、3及び5の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムに於けるBSA回収率は従来の充填剤、即ち参考例2及び3で得られた親水性基の部分が従来のジオール形になっている充填剤を充填したカラムと同様に良好なBSA回収率を示した。尚、実施例1、3及び5の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムで得られたクロマトグラムのBSAのピーク形状は従来の参考例2及び3の充填剤を

表 2

充 填 剤 の 種 類	保 持 時 間 (分)		
	ウラシル	ベンゼン	ナフタレン
参考例2のシリカゲル	1.37	1.83	2.63
参考例3のシリカゲル	1.36	2.28	4.01
実施例1のシリカゲル	1.36	1.88	2.84
実施例3のシリカゲル	1.37	2.04	3.35
実施例5のシリカゲル	1.39	2.28	4.16
参考例4のシリカゲル	1.37	2.57	4.85

【0115】表2の結果から、実施例1、3及び5の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムを使用することにより、ウラシル、ベンゼン、ナフタレンを参考例2、3及び4の充填剤を充填したカラムと同様に良好に分離し得ることが判る。また、本発明に係る充填剤の場合は、本発明に係る一般式〔1〕で示される基のR₁のメチレン鎖の炭素数を変えることによりベンゼン及びナフタレンの保持時間を容易に調整することができることも判る（実施例1：炭素数2、実施例3：炭素

充填したカラムで得られるそれよりテーリングが少なく良好な形状であった。また、実施例3の変性シリカゲルを充填剤として用いた場合のBSA回収率と、これと炭素数が同数の修飾シリル基が導入された参考例4のシリカゲル（但し、末端には1つしか水酸基が導入されていない。）を充填剤として用いた場合のBSA回収率を比較すると、実施例3の変性シリカゲルを充填剤とした場合の方が極めて高い回収率を示していることが判る。このことから良好なタンパク質回収率を得るためには、本発明に係る充填剤のように一般式〔1〕で示される基のR₁の末端に水酸基が導入されていることが必要であることが判る。

【0113】実施例15 ウラシル、ベンゼン、ナフタレンの分析試験

15 実施例14で調製した各カラムを用いて下記の条件でウラシル、ベンゼン及びナフタレンの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表2にその結果を示す。

〔分析条件〕

移動相：CH₃CN/H₂O=30/70 (v/v)

20 流速：0.5ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

試料：ウラシル 0.77mg、ベンゼン 145 μ l及びナフタレン 20mgを60%CH₃CN水溶液 100mlに溶解した液

25 注入量：2 μ l

【0114】

数4、実施例5：炭素数6）。

【0116】実施例16 フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェントインの分析試験

45 実施例14で調製した各カラムを用いて下記の条件でフェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェントインの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表3にその結果を示す。

〔分析条件〕

50 移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル

=90/10(v/v)

流速：0.5ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

試料：フェノバルビタール 2mg、カルバマゼピン 0.5mg、フェニトイン 4mgを上記移動相100mlに溶解した液

g及びフェニトイン 4mgを上記移動相100mlに溶解した液

注入量：20 μ l

【0117】

表 3

充填剤の種類	保持時間(分)		
	フェノバルビタール	カルバマゼピン	フェニトイン
参考例2のシリカゲル	2.87	5.14	5.86
参考例3のシリカゲル	4.02	9.13	10.65
実施例1のシリカゲル	3.13	6.08	7.05
実施例3のシリカゲル	3.45	6.81	8.66
実施例5のシリカゲル	3.87	7.84	10.77
参考例4のシリカゲル	4.12	8.62	12.39

【0118】表3の結果から、実施例1、3及び5の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムは、フェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェニトインを良好に分離していることが判る。一方、従来の充填剤である参考例2及び3の充填剤（シリカゲルの内表面及び外表面に導入された親水性基の部分が従来のジオール形になっている充填剤）を充填したカラムでは、同じ条件でカルバマゼピンとフェニトインのピークが一部重なり、これらを良好に分離することはできなかった。これらのことから、実施例1、3及び5の変性シリカゲルを充填した充填剤には本発明に係る一般式〔1〕で示される基が導入されているために上記3種の薬物を良好に分離することができると考えられる。また、表3の結果から、本発明に係る一般式〔1〕で示される基のR₁のメチレン鎖の炭素数を変えることによりこれら薬物の保持時間を容易に調整することができることも判る（実施例1：炭素数2、実施例3：炭素数4、実施例5：炭素数6）。

【0119】実施例17 牛血清アルブミンの回収試験
実施例2、4、及び6で製造した変性シリカゲルを内径4.6mm、長さ50mmのHPLC用ステンレスカラムにスラリー法によって充填した。これらのカラムを用いて実施例14と同様の条件でBSAの回収率を求めた。表4にその結

果を示す。

【0120】

表 4

充填剤の種類	BSA回収率%
実施例2のシリカゲル	94.5
実施例4のシリカゲル	93.0
実施例6のシリカゲル	87.8

【0121】表4の結果から、シリカゲルに本発明に係る一般式〔1〕で示される基とトリメチルシリル基とを導入した本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムは良好なBSA回収率を示すことが判る。

【0122】実施例18 ウラシル、ベンゼン、ナフタレンの分析試験

実施例17で調製した各カラムを用いて実施例15と同様の条件でウラシル、ベンゼン及びナフタレンの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表5にその結果を示す。

【0123】

表 5

充 填 剤 の 種 類	保 持 時 間 (分)		
	ウラシル	ベンゼン	ナフタレン
実施例 2 のシリカゲル	1.45	2.13	3.45
実施例 4 のシリカゲル	1.39	2.35	4.22
実施例 6 のシリカゲル	1.37	2.59	5.05

【0124】表5の結果から、実施例2、4及び6で調製された本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムにより、ウラシル、ベンゼン及びナフタレンを良好に分離することができることが判る。また、表2と表5のデータの比較から、トリメチルシリル基が導入されていない本発明に係る充填剤（実施例1、3及び5）の代わりにトリメチルシリル基が導入された本発明に係る充填剤（実施例2、4及び6）を使用すると各化合物の保持時間が長くなることも判る。また、表5の結果から、トリメチルシリル基が共存する場合であっても、本発明に係る一般式〔1〕で示される基のR₁のメチレン

表 6

充 填 剤 の 種 類	保 持 時 間 (分)		
	フェノバルビタール	カルバマゼピン	フェニトイン
実施例 2 のシリカゲル	3.84	7.65	9.95
実施例 4 のシリカゲル	4.54	9.10	13.11
実施例 6 のシリカゲル	4.51	9.86	14.61

【0127】表6の結果から、実施例2、4及び6で調製された本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムを用いることにより、それぞれの薬物を良好に分離し得ることが判る。また、表3と表6のデータの比較から、トリメチルシリル基が導入されていない本発明に係る充填剤（実施例1、3及び5）を使用した場合よりも、トリメチルシリル基が導入された本発明に係る充填剤（実施例2、4及び6）を使用した場合の方が各薬物の保持時間が長くなることも判る。また、表6の結果から、トリメチルシリル基が導入された場合でも、本発明に係る一般式〔1〕で示される基のR₁のメチレン鎖の炭素数を変えることにより各薬物の保持時間を容易に調整することができることも判る（実施例2：炭素数2、実施例4：炭素数4、実施例6：炭素数6）。

【0128】実施例20 牛血清アルブミンの回収試験
実施例7、9、11及び参考例6、7、8で製造したシリカゲルを内径4.6mm、長さ50mmのHPLC用ステンレスカラムにスラリー法によって充填した。各カラムを用いて実施例14と同様の条件でBSAの回収率を求めた。表7

鎖の素数を変えることにより、ベンゼン及びナフタレンの保持時間を容易に調整することができることも判る（実施例2：炭素数2、実施例4：炭素数4、実施例6：炭素数6）。

15 【0125】実施例19 フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの分析試験
実施例17で調製した各カラムを用いて実施例16と同様の条件でフェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェニトインの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表6にその結果を示す。

【0126】

にその結果を示す。

【0129】

表 7

充填剤の種類	BSA回収率%
参考例6のシリカゲル	92.0
参考例7のシリカゲル	91.0
参考例8のシリカゲル	88.6
実施例7のシリカゲル	94.2
実施例9のシリカゲル	93.9
実施例11のシリカゲル	94.3

45 【0130】表7の結果から、実施例7、9及び11の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムに於けるBSA回収率は、従来のジオール形の充填剤、即ち参考例6、7及び8で調製された充填剤を充填したカラムに於けるそれと同様に良好であることが判る。また、実施例7、9及び11の変性シリカゲルを充填剤と

して充填したカラムで得られたクロマトグラムのBSAのピーク形状はテーリングが少ない良好な形状であった。

【0131】実施例 21 ウラシル、ベンゼン、ナフタレンの分析試験

実施例 20 で調製した各カラムを用いて実施例 15 と同 05

表 8

充 填 剤 の 種 類	保 持 時 間 (分)		
	ウラシル	ベンゼン	ナフタレン
参考例 6 のシリカゲル	1.34	1.93	3.00
参考例 7 のシリカゲル	1.38	2.29	4.31
参考例 8 のシリカゲル	1.26	1.77	2.50
実施例 7 のシリカゲル	1.32	2.06	3.50
実施例 9 のシリカゲル	1.33	2.16	3.85
実施例 11 のシリカゲル	1.33	2.52	5.08

【0133】表 8 の結果から、実施例 7、9 及び 11 の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムにより、ウラシル、ベンゼン及びナフタレンを、参考例 6、7 及び 8 の従来の充填剤（シリカの内表面及び外表面に導入された親水性基の部分が従来のジオールの形になっている充填剤）を充填したカラムと同様に良好に分離できることが判る。また、本発明に係る充填剤に於て 25

表 9

充 填 剤 の 種 類	保 持 時 間 (分)		
	フェノバルビタール	カルバマゼピン	フェニトイン
参考例 6 のシリカゲル	3.29	5.54	7.22
参考例 7 のシリカゲル	4.51	10.25	13.01
参考例 8 のシリカゲル	2.27	9.56	8.99
実施例 7 のシリカゲル	3.81	6.95	9.54
実施例 9 のシリカゲル	3.97	7.19	10.12
実施例 11 のシリカゲル	4.67	8.70	13.56

【0136】表 9 の結果から、実施例 7、9 及び 11 の本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムにより、各薬物を参考例 6、7 及び 8 の充填剤を充填したカラムを使用した場合と同等以上に良好に分離し得ることが判る。特に、実施例 11 の充填剤を充填したカラムを用いると、参考例 6、7 及び 8 の充填剤を充填したカラムを用いた場合よりもカルバマゼピンとフェニトインをより良好に分離し得ることが判る。また、表 9 の結果から本発明に係る一般式 [1] で示される基の R₁ のメチレン鎖の炭素数を変えることにより、各薬物の保持 50

様の条件でウラシル、ベンゼン及びナフタレンの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表 8 にその結果を示す。

【0132】

することができるとも判る（実施例 7：炭素数 2、実施例 9：炭素数 4、実施例 11：炭素数 6）。

【0134】実施例 22 フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの分析試験

実施例 20 で調製した各カラムを用いて実施例 16 と同様の条件でフェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェニトインの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表 9 にその結果を示す。

【0135】

時間を容易に調整することができるとも判る（実施例 1：炭素数 2、実施例 3：炭素数 4、実施例 5：炭素数 6）。

【0137】実施例 23

牛血清アルブミンの回収試験

実施例 8、10、12 及び 13 で製造したシリカゲルを内径 4.6mm、長さ 50mm の HPLC 用ステンレスカラムにスラリー法によって充填した。各カラムを用いて実施例 14 と同様の条件で BSA の回収率を求めた。表 10 にその結果を示す。

【0138】

表 10

充填剤の種類	BSA回収率%
実施例8のシリカゲル	94.6
実施例10のシリカゲル	91.7
実施例12のシリカゲル	86.9
実施例13のシリカゲル	88.4

及び13の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムに於けるBSA回収率は何れも良好であることが判る。

【0140】実施例24 ウラシル、ベンゼン、ナフタレンの分析試験

- 05 実施例23で調製した各カラムを用いて実施例15と同様の条件でウラシル、ベンゼン及びナフタレンの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表11にその結果を示す。

【0141】

【0139】表10の結果から、実施例8、10、12

表 11

充填剤の種類	保持時間(分)		
	ウラシル	ベンゼン	ナフタレン
実施例8のシリカゲル	1.32	2.28	4.18
実施例10のシリカゲル	1.34	2.50	4.90
実施例12のシリカゲル	1.34	2.84	6.28
実施例13のシリカゲル	1.29	2.67	5.26

【0142】表11の結果から、実施例8、10及び12の本発明の変性シリカゲルを充填剤（トリメチルシリル基が導入されている）として充填したカラムと、実施例13の本発明の変性シリカゲルを充填剤（ジメチルシリル基が導入されている）として充填したカラムの何れを用いた場合でも、ウラシル、ベンゼン及びナフタレンを良好に分離し得ることが判る。また、表8と表11のデータの比較から、トリメチルシリル基やジメチルシリル基が導入されていない本発明に係る充填剤（実施例7、9及び11の充填剤）に比較して、トリメチルシリル基等が導入された本発明に係る充填剤（実施例8、10、12及び13の充填剤）を用いた方が、各化合物の

表 12

保持時間が長くなることも判る。また、表11の結果から、本発明に係る一般式[1]で示される基のR₁のメチレン鎖の炭素数を変えることにより保持時間を容易に調整することができることも判る（実施例8：炭素数2、実施例10：炭素数4、実施例12：炭素数6）。

【0143】実施例25 フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの分析試験

30 実施例23で調製した各カラムを用いて実施例16と同様の条件でフェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェニトインの分析を行い、それぞれの保持時間を求めた。表12にその結果を示す。

【0144】

充填剤の種類	保持時間(分)		
	フェノバルビタール	カルバマゼピン	フェニトイン
実施例8のシリカゲル	4.85	8.76	13.37
実施例10のシリカゲル	5.00	9.53	15.18
実施例12のシリカゲル	6.18	11.33	20.55
実施例13のシリカゲル	5.20	9.11	15.81

【0145】表12の結果から、実施例8、10及び12の本発明の変性シリカゲルを充填剤（トリメチルシリル基が導入されている）として充填したカラムと、実施例13の本発明の変性シリカゲルを充填剤（ジメチルシリル基が導入されている）として充填したカラムの何れ

を用いても、それぞれの薬物を良好に分離し得ることが判る。また、表9と表12のデータの比較から、トリメチルシリル基やジメチルシリル基が導入されていない本発明に係る充填剤（実施例7、9及び11の充填剤）を用いた場合よりも、トリメチルシリル基等が導入された

本発明に係る充填剤（実施例 8、10、12 及び 13 の充填剤）を用いた場合の方が、各薬物の保持時間を長くすることができることや、実施例 8、10、12 及び 13 の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムを用いると、従来の充填剤（参考例 6、7 及び 8 の充填剤）を充填したカラムを用いた場合よりもカルバマゼピンとフェニトインをより良好に分離することができることも判る。また、表 12 のデータから、本発明に係る一般式〔1〕で示される基の R₁ のメチレン鎖の炭素数を変えることにより保持時間を容易に調整することができることや（実施例 8：炭素数 2、実施例 10：炭素数 4、実施例 12：炭素数 6）、表 12 の実施例 12 及び 13 の変性シリカゲルを充填剤として用いた場合のデータの比較から、トリメチルシリル基をジメチルシリル基に変えると保持時間は減少するが、薬物の分離は良好であることも判る。

【0146】実施例 26 血清試料の直接注入によるフェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの分析試験

実施例 12 で製造したシリカゲルを内径 4.6mm、長さ 150mm の HPLC 用ステンレスカラムにスラリー法によって充填した。このカラムを用いて下記に示した分析条件で牛胎児血清、及び牛胎児血清にフェノバルビタール 20 µg/ml、カルバマゼピン 5 µg/ml 及びフェニトイン 40 µg/ml を添加したものを試料として分析した。

【0147】〔分析条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル = 90/10 (v/v)

流速：1.2ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

試料注入量：20 µl

【0148】得られたクロマトグラムを図-1 及び図-2 に示す。図-1 は牛胎児血清を試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークが注入後直ちに出現すること、即ち、牛胎児血清タンパク質は、カラムに吸着されことなく溶出することが判る。図-2 は、牛胎児血清に上記 3 種（フェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトイン）の薬物を添加したものを試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークの後に、フェノバルビタール、カルバマゼピン及びフェニトインの各ピークが溶出し、良好に分離されることが判る。尚、図 2 中、1 はフェノバルビタールのピークを、2 はカルバマゼピンのピークを 3 はフェニトインのピークを夫々示す。

【0149】実施例 27 血清試料の直接注入によるリドカインの分析試験

実施例 26 で調製したカラムを用いて下記に示した分析条件で牛胎児血清、及び牛胎児血清にリドカイン 150 µg/ml を添加したものを試料として分析した。

〔分析条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル = 95/5 (v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

05 検出波長：254nm

試料注入量：20 µl

【0150】得られたクロマトグラムを図-3 及び図-4 に示す。図-3 は牛胎児血清を試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークが注入後直ちに出現すること、即ち、牛胎児血清タンパク質はカラムに吸着されことなく溶出することが判る。図-4 は、牛胎児血清にリドカインを添加したものを試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークの後に、リドカインのピーク（↓印）が溶出し、血清成分と良好に分離されることが判る。

【0151】実施例 28 血清試料の直接注入によるプリミドンの分析試験

実施例 26 で調製したカラムを用いて下記に示した分析条件で牛胎児血清及び牛胎児血清にプリミドン 100 µg/ml を添加したものを試料として分析した。

〔分析条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル = 98/2 (v/v)

流速：1.0ml/min

25 測定温度：30℃

検出波長：230nm

試料注入量：20 µl

【0152】得られたクロマトグラムを図-5 及び図-6 に示す。図-5 は牛胎児血清を試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークが注入後直ちに出現することが判る。図-6 は、牛胎児血清にプリミドンを添加したものを試料としたもので、牛胎児血清タンパク質のピークの後に、プリミドンのピーク（↓印）が溶出し、血清成分と良好に分離されることが判る。

【0153】実施例 29 カラムスイッチング法による血清試料中のフェノバルビタール、カルバマゼピン、フェニトインの分析試験

実施例 12 で製造したシリカゲルを内径 4.6mm、長さ 35mm の HPLC 用ステンレスカラムにスラリー法によって充填し前処理用カラムとした。図-7 に示す装置を用いてカラムスイッチング法によって試料（人血清にフェノバルビタール 20 µg/ml、カルバマゼピン 5 µg/ml 及びフェニトイン 40 µg/ml を添加したもの）を分析した。即ち、前処理用移動相をバルブの点線で示す流路に流すことにより前処理用カラムにより試料中の薬物を濃縮すると共に血清タンパク質をカラム外に排除した。次に、バルブを切り替えて、試料注入後 4 分から 5 分の間、分析用移動相をバルブの実線で示す流路に流すことにより前処理用カラム中の薬物を分析用カラムに導入して分析を行った。尚、前処理条件及び分析条件を下記に示す。

【0154】〔前処理条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

試料注入量：20 μ l

【0155】〔分析条件〕

分析用カラム：Wakosil-II 5C18RS; 4.6 ϕ ×250mm (和光純薬工業(株)製)

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル =65/35(v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

【0156】得られたクロマトグラムを図-8に示す。図-8から明から如く、1. フェノバルビタール、2. カルバマゼピン、及び3. フェニトインの各ピークが順に良好に分離して出現し、それぞれの薬物を良好に定量し得ることが判る。

【0157】実施例30 カラムスイッチング法による血清試料中のイミプラミンの分析試験

実施例29で調製した前処理用カラムを用い、図-9に示す装置によるカラムスイッチング法によって試料(人血清に塩酸イミプラミン 200ng/mlを添加したもの)を分析した。即ち、前処理用移動相をバルブの点線で示す流路に流すことにより前処理用カラムにより試料中の薬物を濃縮すると共に血清タンパク質をカラム外に排除した。次に、バルブを切り替えて、試料注入後6分から11分の間、前処理用移動相をバルブの実線で示す流路に流すことにより前処理用カラム中の薬物を分析用カラムに導入した。再び、バルブを切り替えて分析用移動相をバルブの点線を示す流路に戻し分析を行った。尚、前処理条件及び分析条件を下記に示す。

【0158】〔前処理条件〕

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル =98/2(v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

試料注入量：100 μ l

【0159】〔分析条件〕

分析用カラム：Wakosil-II 5C18RS, 4.6 ϕ ×250mm (和光純薬工業(株))

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=2.5)/アセトニトリル =65/35(v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

検出波長：254nm

【0160】得られたクロマトグラムを図-10に示す(イミプラミンのピーク：↓印)。この結果から、本発明の変性シリカゲルを充填剤として含んでなるカラムを血清試料の前処理カラムとして利用することにより血清

中の微量成分を容易に濃縮できるので、本発明に係るカラムは血清中の微量成分の分析に有用であることが判る。

【0161】実施例31 カラムスイッチング法による

05 血清試料中のインドメタシンの分析試験

実施例29で調製した前処理用カラムを用い、図-9に示す装置によるカラムスイッチング法によって試料(人血清にインドメタシン 1 μ g/mlを添加したもの)を分析した。即ち、前処理用移動相をバルブの点線で示す流路に流すことにより前処理用カラムにより試料中の薬物を濃縮すると共に血清タンパク質をカラム外に排除した。次に、バルブを切り替えて、試料注入後4.5分から8.5分の間、前処理用移動相をバルブの実線で示す流路に流すことにより前処理用カラム中の試料を分析用カラムに導入した。再びバルブを切り替えて分析用移動相をバルブの点線で示す流路に戻し分析を行った。尚、前処理条件及び分析条件を下記に示した。

【0162】〔前処理条件〕

20 移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.9)/アセトニトリル =87/13(v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

試料注入量：20 μ l

【0163】〔分析条件〕

25 分析用カラム：Wakosil-II 5C18RS, 4.6 ϕ ×250mm

移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=2.5)/アセトニトリル =45/55(v/v)

流速：1.0ml/min

測定温度：30℃

30 検出波長：254nm

【0164】得られたクロマトグラムを図-11に示す(インドメタシンのピーク：↓印)。この結果から、本発明の変性シリカゲルを充填剤として含んでなるカラムを血清試料の前処理カラムとして利用することにより血清中の微量成分を容易に濃縮できるので、本発明に係るカラムは血清中の微量成分の分析に有用であることが判る。

【0165】

【発明の効果】以上述べた如く、本発明は、血清等のタンパク質成分を多量に含有する生体試料中の薬物や代謝物を分析するためのクロマトグラフィー用充填剤として有用な、変性シリカゲルと、該変性シリカゲルを含んでなるクロマトグラフィー用充填剤及びこれを用いた生体試料中の成分の分析方法並びに該充填剤を充填してなるクロマトグラフィー用カラムを提供するものであり、本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムを用いて血清等の生体試料の分析を行えば、タンパク質等の巨大分子は変性することなく素通りしてカラム外に排出され、一方試料中の薬物等の比較的低分子の化合物は濃縮、分離溶出されるため、除タンパク質操作を行うこ

となく生体試料中の薬物等の分析を行うことができるという効果を奏する。また、本発明の変性シリカゲルを充填剤として充填したカラムは、上記した如き性質を利用して、試料の除タンパク質用前処理カラムとしても有用なものであり、これと一般の逆相系カラムとを組合せることにより、血清等の生体試料中の低濃度の薬物等を高感度に分析することを可能とする、という効果を奏する。

【0166】更に、本発明の変性シリカゲルは、シリカゲルの内表面及び外表面に同一の修飾基を導入することにより得られるものであるため、製造が容易で且つ同一の品質の充填剤を再現性良く得ることが可能である。更にまた、本発明の変性シリカゲルは、導入する修飾基のメチレン鎖の長さを調整することにより、目的の分析対象物の保持時間を適宜調整することができるという効果をも奏する。

【0167】

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例26で得られた、牛胎児血清を試料とした場合のクロマトグラムを示す。

【図2】図2は実施例26で得られた牛胎児血清に各種薬物を添加したものを試料とした場合のクロマトグラムを示す。

【図3】図3は実施例27で得られた牛胎児血清を試料

とした場合のクロマトグラムを示す。

【図4】図4は実施例27で得られた牛胎児血清にリドカインを添加したものを試料とした場合クロマトグラムを示す。

05 【図5】図5は実施例28で得られた牛胎児血清を試料とした場合のクロマトグラムを示す。

【図6】図6は実施例28で得られた牛胎児血清にプリミドンを添加したものを試料とした場合クロマトグラムを示す。

10 【図7】図7は実施例29のカラムスイッチング法で用いた装置を示す。

【図8】図8は実施例29で得られたクロマトグラムを示す。

15 【図9】図9は実施例30及び実施例31のカラムスイッチング法で用いた装置を示す。

【図10】図10は実施例30で得られたクロマトグラムを示す。

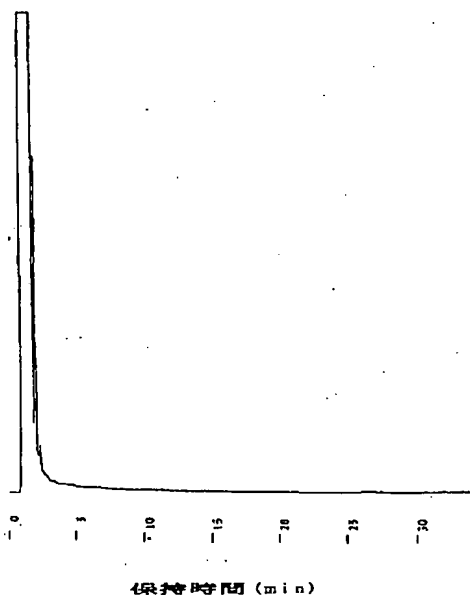
【図11】図11は実施例31で得られたクロマトグラムを示す。

20 【0168】

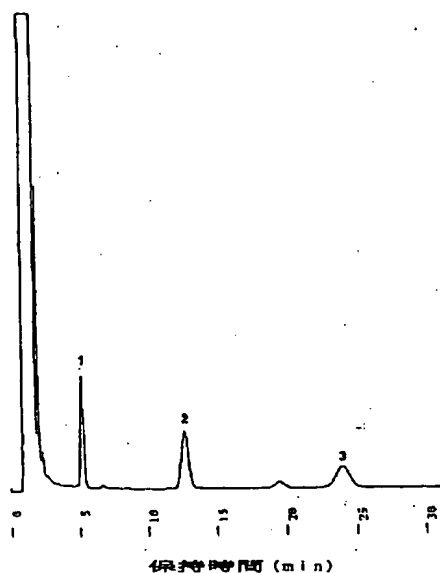
【符号の説明】

1・・・フェノバルビタールのピーク、2・・・カルバマゼピンのピーク、3・・・フェニトインのピーク。

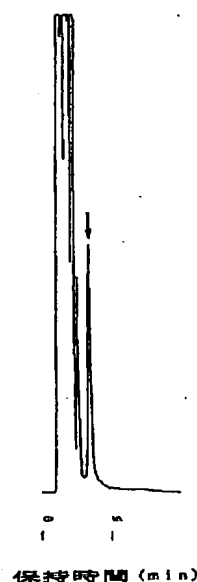
【図1】



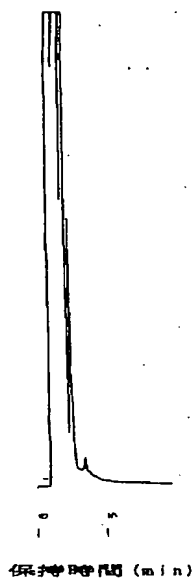
【図2】



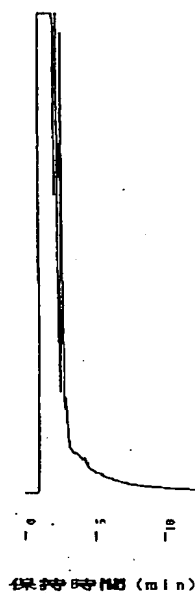
【図4】



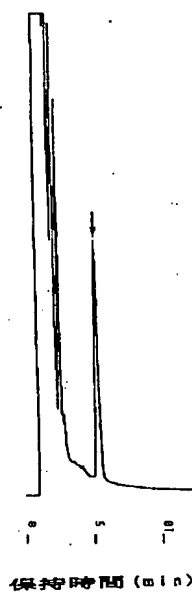
【図3】



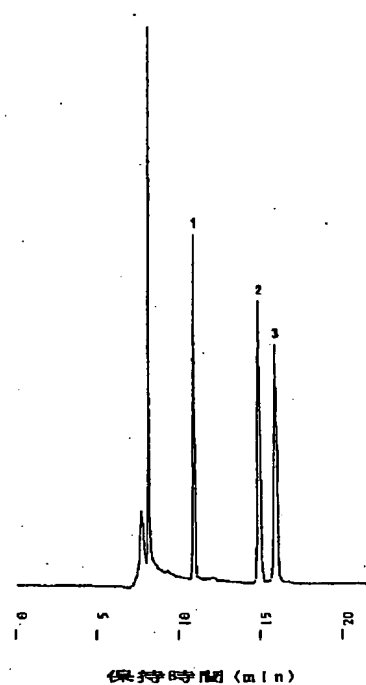
【図5】



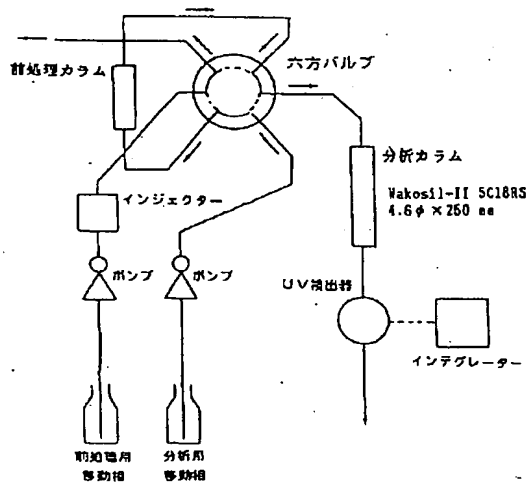
【図6】



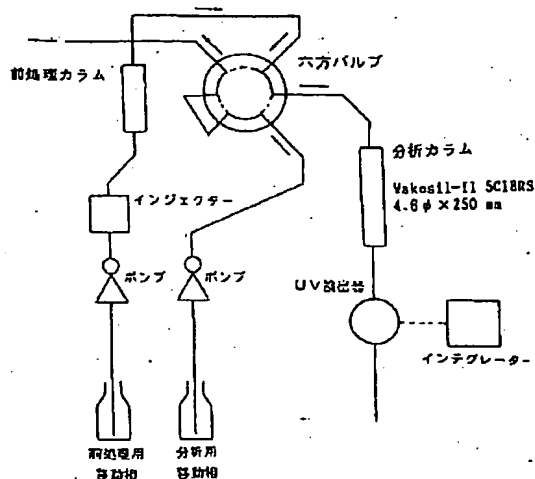
【図8】



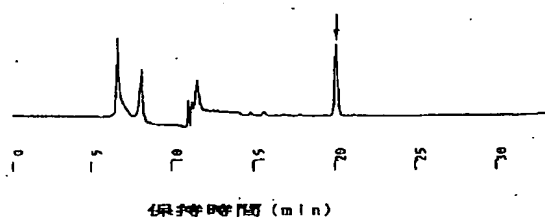
【図7】



【図9】



【図11】



【図10】

